

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
18 août 2005 (18.08.2005)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
**WO 2005/075509 A1**

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> :  
**C07K 14/47**, G01N 33/50, C12N 15/62

(74) Mandataires : **BREESE, Pierre** etc.; Breesé Derambure  
Majerowicz, 38, avenue de l'Opéra, F-75002 Paris (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR2005/000222

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de  
protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO,  
CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,  
GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG,  
KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG,  
MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH,  
PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN,  
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(22) Date de dépôt international : 2 février 2005 (02.02.2005)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
0400964 2 février 2004 (02.02.2004) FR  
0405954 2 juin 2004 (02.06.2004) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :  
SYNT:EM [FR/FR]; Allée Charles Babbage, Parc Scien-  
tifique Georges Besse, F-30900 Nîmes (FR).

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre  
de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,  
ZW), eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),  
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,  
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO,  
SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN,  
GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : **MATH-  
IEU, Danièle** [FR/FR]; 81, boulevard de la Lironde,  
F-34980 Montferrier-sur-Lez (FR). **TEMSAMANI,  
Jamal** [FR/FR]; 370, rue Etienne Ozi, F-30900 Nîmes  
(FR). **KACZOREK, Michel** [FR/FR]; 81, boulevard de la  
Lironde, F-34980 Montferrier-sur-Lez (FR).

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: ANGIOGENESIS INHIBITORS, COMPOSITIONS CONTAINING SAME AND USE THEREOF FOR TREATING  
DISEASES RELATED TO ANGIOGENETIC DEREGLATION

(54) Titre : INHIBITEURS DE L'ANGIOGENESE, COMPOSITIONS LES CONTENANT ET LEUR UTILISATION POUR LE  
TRAITEMENT DES MALADIES LIEES A UNE DEREGLATION DE L'ANGIOGENESE

(57) Abstract: The invention concerns a peptide molecule capable of interfering with the HLH domain of TAL-1, consisting of or comprising at least 10 successive amino acids and preferably at least 15 successive amino acids of the HLH domain of TAL-1 of sequence: QQNVNGAFAELRKLIPTHPDCKLSKNEILRLAMKYINFLA corresponding to SEQ ID No. 1 whereof the listing of sequences is annexed or an equivalent sequence, said molecule being advantageously associated with a vector. The invention also concerns a pharmaceutical composition containing said peptide molecule and the use of a compound capable of interacting with the HLH domain of TAL-1 for preparing a medicine designed for the prevention and/or treatment of diseases related to angiogenesis, preferably the treatment of cancers, arteriosclerosis and diabetes. The invention further concerns a method for identifying a biologically active compound capable of being used in the prevention and/or treatment of diseases related to angiogenesis, preferably the treatment of cancers treatment of cancers, arteriosclerosis and diabetes which consists in detecting inhibition of the interaction between the HLH domain of TAL-1 and its partner E47 in the presence of said compound.

(57) Abrégé : La présente invention concerne une molécule peptidique capable d'interférer avec le domaine HLH de TAL-1, constituée par ou comprenant au moins 10 acides aminés successifs et, de préférence, au moins 15 acides aminés successifs du domaine HLH de TAL-1 de séquence : QQNVNGAFAELRKLIPTHPDCKLSKNEILRLAMKYINFLA correspondant à la SEQ ID No. 1 dans le listage de séquences en annexe ou une séquence équivalente, ladite molécule étant avantageusement associée à un vecteur. La présente invention concerne également une composition pharmaceutique contenant ladite molécule peptidique et l'utilisation d'un composé capable d'interagir avec le domaine HLH de TAL-1 pour la préparation d'un médicament destiné à la prévention et/ou au traitement des maladies liées à l'angiogenèse et, de préférence, au traitement des cancers, de l'artériosclérose et du diabète. Enfin, la présente invention concerne également un procédé pour identifier un composé biologiquement actif susceptible d'être utilisé dans la prévention et/ou le traitement des maladies liées à l'angiogenèse et, de préférence, le traitement des cancers, de l'artériosclérose et du diabète consistant à détecter l'inhibition de l'interaction entre le domaine HLH de TAL-1 et son partenaire E47 en présence dudit composé.

WO 2005/075509 A1



— avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

INHIBITEURS DE L'ANGIOGENESE, COMPOSITIONS LES  
CONTENANT ET LEUR UTILISATION POUR LE TRAITEMENT DES  
MALADIES LIEES A UNE DEREGULATION DE L'ANGIOGENESE.

5           La présente invention se rapporte au domaine du  
traitement des maladies liées à une dérégulation de  
l'angiogenèse telles que les cancers, l'artériosclérose et  
le diabète. L'invention concerne des inhibiteurs de  
l'angiogenèse particuliers capables d'interférer avec les  
10 différentes interactions de TAL-1 susceptibles d'être  
conjugués à des vecteurs tels que des peptides, des  
particules (liposomes, nanoparticules, etc.) et des  
polymères. L'invention concerne également une composition  
pharmaceutique contenant de tels inhibiteurs et leur  
15 utilisation pour le traitement de maladies liées à  
l'angiogenèse, tout particulièrement pour le traitement des  
cancers, de l'artériosclérose et du diabète.

          L'angiogenèse, processus de remodelage des  
20 capillaires préexistants, conduit à la formation de  
nouveaux vaisseaux [Riseau, Nature 386 ; 671 (1997)]. Dans  
des conditions physiologiques, l'angiogenèse est  
étroitement régulée sous le contrôle d'une balance locale  
entre facteurs stimulateurs (angiogéniques) et inhibiteurs  
25 (angiostatiques). Chez l'adulte, la plupart des cellules de  
l'endothélium (plus de 99 %) sont à l'état quiescent. En  
réponse à un signal angiogénique, les cellules  
endothéliales (CEs) sortent de leur dormance et deviennent  
"activées" pour enclencher un programme d'angiogenèse. Ce  
30 processus complexe inclut le mouvement des CEs pour sortir  
des capillaires et leur migration vers le site  
angiogénique, leur prolifération et leur différenciation  
pour former de nouveaux capillaires.

          Une dérégulation de l'angiogenèse est observée dans  
35 certaines pathologies comme l'artériosclérose, le diabète

et les tumeurs [Carmeliet, Nat Med 6 ; 389 (2000)]. Quand les tumeurs atteignent une taille critique créant des conditions d'hypoxie, les cellules tumorales relarguent des cytokines, telles que VEGF ou bFGF, connues pour initier ou  
5 stimuler l'angiogenèse. L'angiogenèse, requise pour la croissance des tumeurs, est également un facteur majeur de propagation des cellules malignes dans l'organisme (métastases).

En dépit de progrès indéniables dans la lutte contre  
10 certains cancers, force est de reconnaître que globalement les cancers progressent et qu'ils constituent une cause majeure de mortalité. La découverte de nouveaux médicaments constitue une des priorités de la recherche médicale. Les progrès récents des connaissances scientifiques sur  
15 l'angiogenèse tumorale permettent de croire que le traitement fondé sur l'anti-angiogenèse offrirait une nouvelle modalité pour maîtriser la croissance tumorale chez les patients atteints de cancer.

Plusieurs stratégies anti-angiogéniques ont été  
20 développées pour inhiber la fonction de facteurs activateurs (VEGF ou bFGF), notamment avec des anticorps neutralisants dirigés contre la cytokine ou contre son récepteur. D'autres molécules anti-angiogéniques ont été dérivées d'inhibiteurs physiologiques présents dans le  
25 système hémostatique, comme le plasminogène (angiostatine), le collagène (endostatine) ou encore le fibrinogène (alphastatine) ; ces molécules inhibent l'adhésion des CEs à la matrice extracellulaire requise pour leur morphogenèse.

Une autre stratégie très peu explorée à ce jour est  
30 de cibler directement les événements intracellulaires de la cellule endothéliale en réponse à des stimuli angiogéniques. Ainsi, la Demanderesse a montré que TAL-1, facteur de transcription de la famille basic-Helix-Loop-Helix (bHLH), module spécifiquement la réponse angiogénique  
35

des cellules endothéliales : il contrôle leurs propriétés de migration et stimule leur différenciation en capillaires [Lazrak et al., J Cell Sci sous presse (2004)]. Les expériences de recombinaison homologue chez la souris ont démontré que le gène *tal-1* est requis pour certaines étapes du développement hématopoïétique et vasculaire. Les embryons *tal-1*<sup>-/-</sup> (n'exprimant pas *tal-1*) présentent une angiogenèse défectueuse dans le sac vitellin qui semble refléter un défaut intrinsèque des cellules endothéliales [Visvader et al., Genes Dev 12 ; 473 (1998)]. Chez l'adulte, en dehors de certains progéniteurs hématopoïétiques de la moelle osseuse, la protéine TAL-1 est exprimée dans les petits vaisseaux en formation, mais pas dans l'endothélium mature quiescent [Kallianpur et al., Blood 83 ; 1200 (1994)]; de manière significative, un haut niveau d'expression de TAL-1 est observé dans la vasculature de tumeurs humaines [Chetty et al., J Pathol 181 ; 311 (1997)]. TAL-1 constitue donc un marqueur des CEs angiogéniques. De ce fait, nous avons ciblé TAL-1 pour inhiber l'angiogenèse.

La Demanderesse a développé de nouvelles molécules capables de bloquer spécifiquement l'activité de TAL-1 dans les cellules endothéliales. Le motif HLH de TAL-1 est requis pour toutes les activités du facteur TAL-1 connues à ce jour : fixation à l'ADN ou interaction avec d'autres facteurs nucléaires notamment E47 ou LMO 2 [Hsu et al., Proc. Natl. Acad. Sci 91 ; 3181 (1994) ; Vitelli et al., Mol Cell Biol 20 ; 5330 (2000)](Figure 1). La Demanderesse a développé des inhibiteurs peptidiques capables d'entrer en compétition avec le domaine HLH de TAL-1. Ces inhibiteurs peptidiques ont été ensuite couplés à des vecteurs peptidiques pour permettre et/ou améliorer leur internalisation dans les cellules.

Les travaux et résultats concernant ces peptides vecteurs et leur utilisation comme vecteurs pour transporter des molécules actives ont été décrits dans la demande de brevet français N° 97/10297 déposée le 08 décembre 1997.

Dans les séquences peptidiques rapportées ci-après, les acides aminés sont représentés par leur code à une lettre, mais ils peuvent être aussi représentés par leur code à trois lettres selon la nomenclature ci-dessous.

	A	Ala	alanine
	C	Cys	cystéine
	D	Asp	acide aspartique
	E	Glu	acide glutamique
15	F	Phe	phénylalanine
	G	Gly	glycine
	H	His	histidine
	I	Ile	isoleucine
	K	Lys	lysine
20	L	Leu	leucine
	M	Met	méthionine
	N	Asn	asparagine
	P	Pro	proline
	Q	Gln	glutamine
25	R	Arg	arginine
	S	Ser	sérine
	T	Thr	thréonine
	V	Val	valine
	W	Trp	tryptophane
30	Y	Tyr	tyrosine

La présente invention a donc pour objet un inhibiteur peptidique (également appelé molécule peptidique) capable d'interférer avec le domaine HLH de TAL-1, constitué par ou comprenant au moins 10 acides aminés successifs et, de préférence, au moins 15 acides aminés successifs du domaine HLH de TAL-1 de séquence :

QQNVNGAFAELRKLIPTHPDKKLSKNEILRLAMKYINFLA

correspondant à la SEQ ID No. 1 dans le listage de séquences en annexe ou une séquence équivalente.

Par « séquence équivalente », on entend la séquence d'un variant connu du domaine HLH de TAL-1 mais aussi une séquence présentant un ou plusieurs substitutions, délétions et/ou additions d'acides aminés par rapport à la séquence SEQ ID No. 1, lesdites substitutions, délétions et/ou additions d'acides aminés ne modifiant pas les activités du facteur TAL-1 ainsi obtenu comme sa fixation à l'ADN ou son interaction avec d'autres facteurs nucléaires notamment E47 ou LMO 2. L'homme du métier connaît différentes techniques pour vérifier les activités du facteur de transcription TAL-1 ainsi obtenu. De plus, dans le cadre de la présente invention, on entend par « séquence équivalente », des peptides qui présentent une modification post-traductionnelle et/ou une modification chimique en particulier une glycosylation, une amidation, une acylation, une acétylation, une méthylation ainsi que les peptides qui portent un groupement protecteur. Les dérivés des peptides de l'invention peuvent également être ceux dont un ou plusieurs acides aminés sont des énantiomères, des diastéréoisomères, des acides aminés naturels de conformation D, des acides aminés rares notamment l'hydroxyproline, l'hydroxylysine, l'allo-hydroxylysine, la 6-N-méthyllysine, la N-éthylglycine, la N-méthylglycine, la N-éthylasparagine, l'allo-isoleucine, la N-méthylisoleucine, la N-méthylvaline, la pyroglutamine,

l'acide aminobutyrique et les acides aminés synthétiques notamment l'ornithine, la norleucine, la norvaline, la cyclohexyl-alanine et les oméga-acides aminés. Les dérivés couvrent également les rétropeptides et les rétro-inverso-peptides, de même que les peptides dont la chaîne latérale d'un ou plusieurs des acides aminés est substituée par des groupements qui ne modifient pas l'activité antimicrobienne des peptides de l'invention.

Par « molécule peptidique », on entend dans le cadre de la présente invention une molécule constituée par ou qui comprend au moins une séquence peptidique, ladite molécule pouvant comprendre en outre des entités chimiques additionnelles autres que des acides aminés.

De préférence, l'inhibiteur ou molécule peptidique objet de la présente invention est choisi parmi le composé 1 de séquence : QQNVNGAFAELRKLIPTHPDKKLSKNEILRLAMKYINFLA (SEQ ID No. 1 dans la liste de séquences en annexe), le composé 2 de séquence : VRRIFTNSRERWRQQNVNGAFAELRKLI (SEQ ID No. 2 dans la liste de séquences en annexe) et le composé 3 de séquence : PTHPPDKKLSKNEILRLAMKYINFLA (SEQ ID No. 3 dans la liste de séquences en annexe) ou une séquence équivalente auxdites séquences. Ainsi, l'inhibiteur de la présente invention est constitué par ou comprend une séquence choisie parmi les séquences suivantes :

- QQNVNGAFAELRKLIPTHPDKKLSKNEILRLAMKYINFLA (SEQ ID No. 1 dans la liste de séquences en annexe),

- VRRIFTNSRERWRQQNVNGAFAELRKLI (SEQ ID No. 2 dans la liste de séquences en annexe) et

- PTHPPDKKLSKNEILRLAMKYINFLA (SEQ ID No. 3 dans la liste de séquences en annexe)

ou une séquence équivalente auxdites séquences.

Dans une forme de mise en œuvre préférée, l'inhibiteur ou molécule peptidique objet de la présente



invention est associé à un vecteur. De façon avantageuse, ce vecteur est capable d'augmenter le transport dudit inhibiteur dans les cellules et organes cibles.

L'homme du métier connaît différents types de vecteurs peptidiques utilisables dans le cadre de la présente invention. Ainsi, à titre d'exemples et de façon non-limitative, le vecteur est choisi, parmi le groupe comprenant :

- un peptide linéaire dérivé de protégrines ou de tachyplésines [brevet français N° 97/10297],

- un peptide linéaire comprenant un domaine de transduction tels que les domaines de transduction de la protéine Tat de HIV-1 [Fawell et al., Proc. Natl. Acad. Sci 91 ; 664 (1994) ; Schwarze et al., Science 285 ; 1569 (1999)] et les domaines de transduction dérivés de la troisième hélice d'Antennapedia [Derossi et al., J. Biol. Chem 269, 10444 (1994) ; Brevet US 5888762).

- des particules comme les liposomes [Dass and Su.(2001) Drug Deliv. 8:191-213] ou des nanoparticules [Panyam and Labhasetwar (2003) Adv Drug Deliv Rev. 55:329-47 ; Douglas et al. (1987) Crit Rev Ther Drug Carrier Syst. 3:233-61],

- des polymères tels que le polyéthylène glycol (PEG) [Greenwald et al. (2003) Adv Drug Deliv Rev. 55:217-50].

L'invention envisage tout particulièrement comme peptide linéaire dérivé de Protégrines, un peptide qui répond à la formule (I) suivante :

BX(X ou B)BXXXXBBBXXXXXXB (I)

et comme peptide linéaire dérivé de Tachyplésines, un peptide qui répond à la formule (II) suivante :

(B ou X)XXXBXXXXBXXXXBBXB (II),

dans lesquelles :

- les groupes B, identiques ou différents, représentent un résidu d'acide aminé dont la chaîne latérale porte un groupement basique, et

5        - les groupes X, identiques ou différents, représentent un résidu d'acide aminé aliphatique ou aromatique

ou un fragment de ceux-ci constitué d'une séquence d'au moins 5 et de préférence d'au moins 7 acides aminés successifs des peptides de formules (I) ou (II).

10        La présente invention concerne également l'utilisation d'un vecteur tel que défini précédemment pour vectoriser dans les cellules, les tissus et/ou les organes un inhibiteur peptidique tel que défini précédemment.

15        La liaison entre l'inhibiteur ou molécule peptidique de Tal-1 capable d'interférer avec les différentes interactions de TAL-1 tel que précédemment défini et du vecteur est choisie parmi une liaison covalente, une liaison hydrophobe, une liaison ionique, une liaison clivable ou une liaison non clivable dans les milieux physiologiques ou à l'intérieur des cellules.

20        Cette liaison peut être directe ou indirecte par l'intermédiaire d'un bras de liaison (linker) et effectuée au moyen d'un groupe fonctionnel naturellement présent ou introduit soit sur le vecteur, soit sur l'inhibiteur, soit sur les deux. Ce bras de liaison, s'il est présent, doit être acceptable compte tenu de la nature chimique et de l'encombrement tant du vecteur que de l'inhibiteur. On peut

25        citer, à titre d'exemple et de façon non-limitative, des linkers contenant des groupements alkyle, aryle, aralkyle ou peptidique, des esters, aldéhydes ou acides d'alkyle, aryle ou aralkyle, des groupements anhydrides, sulfhydriles, ou carboxyles tels que les dérivés de l'acide maleymil benzoïque, de l'acide maleymil propionique et des

30       

35

dérivés succinimidyle, des groupes dérivés du bromure ou chlorure de cyanogène, carbonyldiimidazole, des esters de succinimide ou des halogénures sulphoniques.

Comme groupes fonctionnels, on peut citer : -OH, -SH, -COOH, ou -NH<sub>2</sub>. Ainsi, l'inhibiteur peut être lié par des liaisons covalentes au niveau des extrémités N-terminale ou C-terminale ou bien au niveau des chaînes latérales du peptide vecteur.

Un type de liaison préféré entre l'inhibiteur de l'angiogenèse et le vecteur implique au moins un pont dissulfure.

De façon particulièrement avantageuse, l'inhibiteur de la présente invention est choisi parmi les deux composés suivants :

- composé 4 :



- composé 5 :



La présente invention concerne également une composition pharmaceutique comprenant comme principe actif au moins un inhibiteur (ou molécule) peptidique tel que défini précédemment, avantageusement associé dans ladite composition à un véhicule acceptable.

De préférence, ladite composition pharmaceutique se présente sous une forme appropriée pour une administration par voie parentérale, par voie orale, par voie rectale, par voie nasale, par voie transdermique, par voie pulmonaire ou par voie centrale. Par « véhicule », on entend selon la présente invention, toute substance qui est ajoutée à

l'inhibiteur de l'invention pour favoriser son transport, éviter sa dégradation substantielle dans ladite composition et préserver ses propriétés inhibitrices. Le véhicule est choisi en fonction du type d'application listé ci-dessus de la composition.

La présente invention a aussi pour objet une méthode de traitement des maladies liées à une dérégulation de l'angiogenèse comme les cancers, l'artériosclérose et le diabète, consistant à administrer à un sujet souffrant d'une telle maladie une quantité efficace d'un inhibiteur ou d'une composition tels que décrits précédemment.

L'invention concerne encore l'utilisation d'un inhibiteur ou d'une composition tels que décrits précédemment pour la préparation d'un médicament destiné au traitement des maladies liées à l'angiogenèse, et plus particulièrement des maladies liées à une dérégulation de l'angiogenèse, et de préférence au traitement des cancers, de l'artériosclérose et du diabète.

L'invention concerne également l'utilisation d'un composé capable d'inhiber l'interaction entre le domaine HLH de TAL-1 et son partenaire E47 pour la préparation d'un médicament destiné à la prévention et/ou au traitement des maladies liées à l'angiogenèse et, de préférence, au traitement des cancers, de l'artériosclérose et du diabète.

Dans une première forme de mise en œuvre de la présente invention, un composé capable d'inhiber l'interaction entre le domaine HLH de TAL-1 et son partenaire E47 est un inhibiteur compétitif du domaine HLH de TAL-1. De façon préférée, un tel composé est une molécule peptidique telle que précédemment définie.

Dans une deuxième forme de mise en œuvre de la présente invention, un composé capable d'inhiber l'interaction entre le domaine HLH de TAL-1 et son partenaire E47 est un composé capable d'inhiber la fixation de TAL-1 sur son partenaire E47. De façon préférée, un tel composé est un anticorps reconnaissant soit un épitope au niveau du domaine HLH de TAL-1, soit un épitope au niveau du domaine HLH de E47.

Les applications et utilisations envisagées pour les inhibiteurs (inhibiteurs ou molécules peptidiques) précédemment décrites s'appliquent mutatis mutandis aux composés capables d'inhiber l'interaction entre le domaine HLH de TAL-1 et son partenaire E47 (méthodes de traitement, compositions pharmaceutiques, etc...).

Enfin, la présente invention concerne un procédé pour identifier un composé biologiquement actif susceptible d'être utilisé dans la prévention et/ou le traitement des maladies liées à l'angiogenèse et, de préférence, le traitement des cancers, de l'artériosclérose et du diabète consistant à détecter l'inhibition de l'interaction entre le domaine HLH de TAL-1 et son partenaire E47 en présence dudit composé.

Par "composé biologiquement actif", la présente invention concerne plus particulièrement tout composé chimique naturel ou synthétique tels que, à titre d'exemples et de façon non exhaustive, des protéines, des polypeptides, des peptides, des aptamères, des lipoprotéines, des polysaccharides, de petites molécules, des molécules non-peptidiques, etc... Après l'identification dudit composé biologiquement actif, il sera facile tester son activité dans la prévention et/ou le traitement des maladies liées à l'angiogenèse et, de préférence, le

traitement des cancers, de l'artériosclérose et du diabète par des méthodes bien connues de l'homme du métier.

L'homme du métier a à sa disposition différentes techniques lui permettant de vérifier si le composé biologiquement actif à tester est capable d'inhiber l'interaction entre le domaine HLH de TAL-1 et son partenaire E47.

Dans une première forme de mise en œuvre, la méthode de l'invention comprend les étapes suivantes :

(a) mettre en contact la protéine TAL-1 (ou un fragment de cette protéine comprenant le domaine HLH), le facteur de transcription E47 (ou un fragment de ce facteur comprenant le domaine qui interagit avec TAL-1) et le composé biologiquement actif à tester,

(b) immunoprécipiter soit la protéine TAL-1 (ou un fragment de cette protéine comprenant le domaine HLH), soit le facteur de transcription E47 (ou un fragment de ce facteur comprenant le domaine qui interagit avec TAL-1),

(c) si, à l'étape (b), la protéine TAL-1 (ou un fragment de cette protéine comprenant le domaine HLH) est immunoprécipitée, détecter dans le immunoprécipitat obtenu à l'étape (b), la présence du facteur de transcription E47 (ou d'un fragment de ce facteur comprenant le domaine qui interagit avec TAL-1),

(d) si, à l'étape (b), le facteur de transcription E47 (ou un fragment de ce facteur comprenant le domaine qui interagit avec TAL-1) est immunoprécipité, détecter dans l'immunoprécipitat obtenu à l'étape (b), la présence de la protéine TAL-1 (ou d'un fragment de cette protéine comprenant le domaine HLH),

dans le cas où le facteur de transcription E47 (ou un fragment de ce facteur comprenant le domaine qui interagit avec TAL-1) n'est pas présent à l'étape (c) ou si la protéine TAL-1 (ou un fragment de cette protéine comprenant

le domaine HLH) n'est pas présente à l'étape (d), ledit composé est un agent susceptible d'être utilisé dans la prévention et/ou le traitement des maladies liées à l'angiogenèse et, de préférence, le traitement des cancers, de l'artériosclérose et du diabète.

L'homme du métier a à sa disposition différentes protéines susceptibles d'être mises en œuvre dans le cadre de la méthode de l'invention. A titre d'exemples, la protéine E47 utilisable peut être la protéine de *Gallus gallus* présente dans Genbank sous le numéro CAE30454 ou la protéine de *Mus musculus* présente dans Genbank sous le numéro AAK18618. De la même façon, la protéine TAL-1 utilisable est la protéine de *Homo sapiens* présente dans Genbank sous le numéro P17542 ou la protéine de *Mus musculus* présente dans Genbank sous le numéro P22091. L'homme du métier connaît dans ces séquences les domaines particulièrement intéressants dans le cadre de la présente invention.

A l'étape (b) de la méthode objet de la présente invention, l'homme du métier saura quel type d'anticorps utilisé en fonction de la protéine à immunoprécipiter (anticorps spécifique du facteur de transcription E47 (ou d'un fragment de ce facteur comprenant le domaine qui interagit avec TAL-1) ou anticorps spécifique de la protéine TAL-1 (ou d'un fragment de cette protéine comprenant le domaine HLH)).

La détection, à l'étape (c), de la présence, dans l'immunoprécipitat obtenu à l'étape (b), du facteur de transcription E47 (ou d'un fragment de ce facteur comprenant le domaine qui interagit avec TAL-1) peut être réalisée par toute technique de l'homme du métier comme, par exemple, un Western Blot utilisant un anticorps spécifique du facteur de transcription E47 (ou d'un fragment de ce facteur comprenant le domaine qui interagit

avec TAL-1), un dosage de l'activité du facteur de transcription E47 (ou d'un fragment de ce facteur comprenant le domaine qui interagit avec TAL-1) ou une méthode mettant en œuvre un facteur de transcription E47  
5 (ou un fragment de ce facteur comprenant le domaine qui interagit avec TAL-1) marqué, ledit marquage pouvant être un marquage radioactif.

La même mise en œuvre peut être réalisée *mutatis mutandis* pour la protéine TAL-1 (ou un fragment de cette  
10 protéine comprenant le domaine HLH) à l'étape (d).

Dans une seconde forme de mise en œuvre, la méthode comprend les étapes suivantes :

(a') mettre en contact la protéine TAL-1 (ou un  
15 fragment de cette protéine comprenant le domaine HLH), le facteur de transcription E47 (ou un fragment de ce facteur comprenant le domaine qui interagit avec TAL-1) et le composé biologiquement actif à tester,

(b') faire migrer sur un gel de polyacrylamide non  
20 dénaturant le mélange obtenu à l'étape (a'),

(c') visualiser l'absence ou la présence du complexe TAL-1 (ou un fragment de cette protéine comprenant le domaine HLH) et E47 (ou un fragment de ce facteur comprenant le domaine qui interagit avec TAL-1).

L'absence de ce complexe à l'étape (c') met en  
25 évidence l'action inhibitrice du composé actif testé et donc que ce composé est un agent susceptible d'être utilisé dans la prévention et/ou le traitement des maladies liées à l'angiogenèse et, de préférence, le traitement des cancers,  
30 de l'artériosclérose et du diabète.

A l'étape (c') de la méthode objet de l'invention, différentes techniques connues de l'homme du métier peuvent être mises en œuvre. A titre d'exemples, on peut réaliser  
35 un Western blot utilisant des anticorps spécifiques de



l'une ou l'autre des protéines TAL-1 ou E47 ou de leurs fragments.

D'autres avantages et caractéristiques de l'invention apparaîtront à la lecture des exemples qui suivent concernant la préparation d'un composé constitué d'un inhibiteur de TAL-1 et d'un peptide vecteur ainsi que sur leurs effets *in vitro* et *in vivo*. Il sera fait référence aux dessins en annexe dans lesquels :

- la figure 1 représente schématiquement la représentation du dimère HLH.

- la figure 2 illustre l'inhibition de l'interaction de TAL-1 et E47 *in vitro* par les différents inhibiteurs.

- la figure 3 illustre l'inhibition de l'interaction de TAL-1 et E47 *in vitro* par l'inhibiteur couplé à un peptide vecteur,

- la figure 4 illustre l'effet des composés sur la survie des cellules endothéliales HUVEC,

- la figure 5 illustre l'effet d'un des composés de l'invention sur la tubulogenèse *in vitro* des cellules endothéliales humaines après 22 heures de culture,

- la figure 6 présente l'effet des composés de l'invention sur l'angiogenèse *in vivo* chez la souris par analyse macroscopique des implants de Matrigel complémentés ou non par des composés de l'invention,

- la figure 7 présente l'effet des composés de l'invention sur l'angiogenèse *in vivo* chez la souris par dosage de l'hémoglobine contenue dans lesdits implants de Matrigel.

## I - Synthèse Chimique.

### 1) Synthèse des inhibiteurs de TAL-1 libres et vectorisés.

Les peptides ont été assemblés sur phase solide selon une stratégie Foc/tu, clivés et déprotégés par l'acide

trifluoroacétique, puis purifiés par chromatographie haute pression préparative en phase inverse et lyophilisés. leur pureté (>95%) et leur identité ont été confirmées par HPLC analytique et par spectrométrie de masse. Séquence des peptides : SynB3 (H-RRLSYSRRRF-NH<sub>2</sub> ; 1394.8 Da, SEQ ID No. 7 dans la liste de séquences en annexe), SynB4 (H-AWSFRVSYRGISYRRSR-NH<sub>2</sub> ; 2145,1 Da, SEQ ID No. 6 dans la liste de séquences en annexe), Tal-HLH (H-QQNVNGAFAELRKLIPTHTPPDKKLSKNEILRLAMKYINFLA-NH<sub>2</sub>, SEQ ID No. 1 dans la liste de séquences en annexe)

## 2) Couplage des inhibiteurs sur les peptides vecteurs.



Activation des vecteurs : Les peptides vecteurs SynB3 et SynB4 ont été traités par SPDP (N-Succinimidyl 3-(2-Pyridylthio)propionate) dans Diméthylformamide (DMF) en présence de DIEA (Diisopropylethylamine). Les peptides résultants (2-Pyridylthio)propionyl-SynB3 (1591.8 Da) et (2-Pyridylthio)propionyl-SynB4 (2342.1 Da) ont été purifiés par HPLC et lyophilisés.

Préparation des conjugués : Chaque peptide vecteur activé (2-Pyridylthio)propionyl-SynBx (1eq) a été solubilisé avec C-TalHLH (1eq) dans DMF, en présence de DIEA de façon à former un pont dissulfure entre la chaîne latérale de la Cystéine de C-TalHLH (composé Tal-HLH synthétisé avec une cystéine en plus) et le 3-Mercapto-propionate porté par le vecteur. Les conjugués résultants (Tal-HLH-SynB3 ; 6303 Da et Tal-HLH-SynB4 ; 7052.6 Da) ont été précipités par addition d'éther, puis purifiés par HPLC et lyophilisés. Le contrôle de qualité par HPLC analytique à 220 nm et par spectrométrie de masse MALDI-TOF a confirmé les masses molaires et a déterminé une pureté supérieure à 96%.

## II - Composés testés.

Les composés testés sont présentés dans le tableau 1 ci-après.

Tableau 1

Composé	Nom	Séquence
1	Tal-HLH	QQNVNGAFAELRKLIPTHTPPDKKLSKNEILRLAMKYINFLA (SEQ ID No. 1 dans la liste de séquences en annexe)
2	Tal-hel 1rb	VRRIFTNSRERWRQQNVNGAFAELRKLI (SEQ ID No. 2 dans la liste de séquences en annexe)
3	Tal-hel 2b	PTHTPPDKKLSKNEILRLAMKYINFLA (SEQ ID No. 3 dans la liste de séquences en annexe)
4	TalHLH-SynB4	 (SEQ ID No. 4 dans la liste de séquences en annexe)
5	TalHLH-SynB3	 (SEQ ID No. 5 dans la liste de séquence en annexe)
6	SynB4	AWSFRVSYRGISYRRSR (SEQ ID No. 6 dans la liste de séquence en annexe)
7	SynB3	RRLSYSRRRF (SEQ ID No. 7 dans la liste de séquence en annexe)

5

### 1) Test de traduction/immunoprécipitation.

Les deux protéines TAL-1 et E47 sont co-traduites *in vitro* en utilisant des plasmides permettant la transcription et la traduction des séquences codantes dans le système TNT-T7-coupled Reticulocyte Lysate, selon les conditions proposées par le fournisseur (Promega). La traduction est réalisée en présence de méthionine S<sup>35</sup>, avec addition ou non de peptides dissous dans une solution d'urée 2M. Une aliquote (1 µl) de chaque traduction est contrôlée par électrophorèse et autoradiographie du gel ; l'addition de peptide jusqu'à 0.7 µg dans le lysat de

10

5

réticulocyte (volume final 25  $\mu$ l) n'affecte pas l'efficacité de la traduction des deux protéines.

Après une incubation de 30 min à 37°C, les produits de traduction sont immunoprécipités par un mélange  
5 d'anticorps monoclonaux anti-TAL-1 (BTL 73 + 2TL 136 ; [Pulford et al., Blood 85 ; 675 (1995)] ) puis analysés par électrophorèse et autoradiographie du gel. On quantifie l'interaction TAL-1-E47 pour chaque point en calculant le ratio E47/TAL-1 obtenu d'après le scan de  
10 l'autoradiographie ; l'intensité de la bande correspondant à TAL-1 sert ici de normalisation dans tous les puits. L'interaction en absence de peptide est arbitrairement établie à 100 %.

## 15 2) Test de cytotoxicité.

Les cellules hématopoïétiques K562 ont été obtenues commercialement auprès de l'ATCC. Les cellules sont  
ensemencées à environ  $10^4$  cellules par puits, 24 h avant l'addition des produits. Elles sont alors à 60-80% de  
20 confluence le jour de l'expérience. Les cellules sont maintenues en culture à 37°C dans une atmosphère à 95% d'humidité et 5% de CO<sub>2</sub> dans un milieu OptiMem®.

Les cellules sont incubées soit avec les composés à des concentrations croissantes pendant 48 heures. A la fin  
25 du temps de culture, le MTT (3-(4,5-diméthylthiazole-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium bromure) est rajouté dans les puits et les plaques de culture sont ensuite incubées pendant 4 heures dans l'étuve. Le dépôt cristallin de formazan résultant est alors dissous par addition de 200  $\mu$ l de  
30 DMF/SDS. La densité optique (DO) est mesurée à 550 nm (référence 630 nm) en utilisant un lecteur de microplaques.

La représentation graphique des pourcentages de DO des puits traités en fonction de la concentration de produits permet de déterminer la DL<sub>50</sub>. Celle-ci correspond

à la concentration du produit inhibant 50% de la croissance.

### 3) Test de survie des cellules endothéliales.

Les cellules endothéliales humaines dérivées de la veine du cordon ombilical, HUVEC, (Clonetics) sont cultivées sur boîtes coatées avec de la gélatine dans du milieu EBM-2 complet (Clonetics) supplémenté de 10 % de sérum de veau fœtal décomplémenté. Les cellules sont utilisées entre les passages 3 et 5. Les cellules ECV 304 (obtenues auprès de l'ATCC) sont cultivées en DMEM avec 10 % de sérum de veau fœtal décomplémenté.

Les cellules sont décollées à la trypsine et suspendues dans un milieu sans sérum (OptiMEM, Invitrogen). Environ  $8 \times 10^3$  cellules dans 200  $\mu$ l sont incubées pendant 20 min en présence de différentes concentrations de peptides, centrifugées, puis ensemencées en milieu EBM2 complet dans des puits (plaque 48 puits) coatés avec du collagène I. Après 24 heures dans l'étuve, la survie cellulaire est estimée par un test MTT, réalisé selon les recommandations du fournisseur (Sigma).

## III – Résultats.

### 1) Effet des peptides inhibiteurs sur l'interaction de TAL-1/E47 *in vitro*.

Nous avons choisi de tester si les composés décrits dans le Tableau 1 (Composés 1, 2 et 3) pouvaient affecter la formation des hétéro dimères TAL-1-E47, médiée par le domaine HLH des deux protéines. Le composé 1 contient tout le domaine HLH de TAL-1 soit l'hélice 1- boucle-hélice 2 ; le composé 2 comprend la région basique et l'hélice 1 ; le composé 3 contient la boucle et l'hélice 2 (voir figure 1).

Nous avons utilisé un test de co-immunoprécipitation de TAL-1 et E47 traduites *in vitro* par des anticorps dirigés contre l'une des protéines.

Nos expériences montrent que le composé Tal-HLH entier (composé 1) inhibe efficacement l'interaction de TAL-1 avec E47 et de façon dose-dépendante (50 à 60% d'inhibition avec 0.2  $\mu$ g ; 90 à 100% avec 0.5  $\mu$ g) (Figure 2 A et B). Les deux autres peptides inhibiteurs (composés 2 et 3) ont un plus faible pouvoir inhibiteur ne dépassant pas 50% dans les plus fortes concentrations (Figure 2A). Nous avons donc choisi d'utiliser le peptide inhibiteur Tal-HLH (composé 1) pour la suite des expériences.

### 2) Effet des peptides inhibiteurs couplés avec des peptides vecteurs sur l'interaction de TAL-1/E47 *in vitro*.

Nous avons voulu savoir si la vectorisation ou le couplage du peptide inhibiteur Tal-HLH ne modifiait pas son effet inhibiteur sur l'interaction de TAL-1 *in vitro* avec E47. L'inhibiteur a été couplé à deux peptides vecteurs (SynB3 et SynB4) via une liaison dissulfure (composés 5 et 4, respectivement). Ces deux peptides vecteurs ont la propriété d'augmenter le transport des molécules à travers les membranes cellulaires. Les résultats présentés dans la figure 3 confirment que la vectorisation du peptide inhibiteur Tal-HLH ne modifie pas son effet inhibiteur. De manière intéressante, l'inhibiteur couplé au vecteur SynB3 (composé 5) s'est révélé plus actif que l'inhibiteur Tal-HLH (composé 1).

### 3) Effet des peptides inhibiteurs couplés sur les cellules hématopoïétiques.

Dans un premier temps, l'effet de l'inhibiteur vectorisé a été étudié sur une lignée hématopoïétique (K562) dont la survie requiert l'activité de TAL-1. La lignée hématopoïétique T (H9) a été utilisée comme contrôle car sa croissance est indépendante de TAL-1. Ces deux lignées leucémiques peuvent survivre plusieurs jours en l'absence de facteurs de croissance, ce qui permet de

tester l'effet des peptides dans un milieu dépourvu de sérum.

Comme attendu, aucune différence significative n'a été observée dans les cellules H9 (TAL-1 négative), selon que le peptide Tal-HLH est vectorisé ou non (résultats non montrés). Par contre, le peptide Tal-HLH a un effet cytotoxique plus élevé sur les cellules K562 (nécessitant l'activité de TAL-1) lorsqu'il est vectorisé (Tableau 2). En effet la DL50, qui correspond à la concentration du produit inhibant 50% de la croissance, est deux fois plus faible pour l'inhibiteur vectorisé (composé 4) que pour l'inhibiteur seul (composé 1).

Tableau 2

Composé	nom	DL 50 (µM)
Composé 1	Tal-HLH	11.5
Composé 4	TalHLH-SynB4	5.7
Composé 6	SynB4	12.3

Ces résultats constituent une première validation que le peptide Tal-HLH vectorisé (Composé 4) est capable d'inhiber spécifiquement l'activité de TAL-1 dans les cellules.

#### 4) Effet des peptides inhibiteurs couplés sur la survie des cellules endothéliales.

Nous avons également étudié les effets de l'inhibiteur libre et vectorisé sur la survie des cellules endothéliales. La figure 4 montre que le composé 1 n'a aucun effet sur la survie des cellules HUVEC. Par contre, une fois couplé (composés 4 et 5) il affecte spécifiquement la survie des cellules HUVECs et de façon dose-dépendante. Le couplage du produit par un peptide vecteur était important pour avoir un effet sur la survie car l'addition simultanée de l'inhibiteur et du peptide vecteur non-

couplés n'avait aucun effet. Dans les cellules ECV 304, utilisées comme contrôle négatif, les composés ont induit une toxicité cellulaire non spécifique qu'ils soient couplés ou non-couplés (résultats non montrés).

5 Ces expériences démontrent l'effet spécifique de l'inhibiteur de TAL-1 lorsqu'il pénètre dans les cellules endothéliales grâce au vecteur peptidique.

10 5) Effet des peptides sur la tubulogenèse *in vitro* des cellules endothéliales humaines (gels de collagène en 3-D).

Les cellules endothéliales HUVEC ensemencées au sein d'un gel de collagène I concentré (1mg/ml) s'arrêtent de proliférer et, en présence de milieu d'activation (MDCB131, 1% sérum de veau fœtal, VEGF 2 ng/ml, bFGF 20 ng/ml et PMA 80 nM), elles s'organisent rapidement en cordons cellulaires pour constituer un réseau primitif ; dans les 24-48 hrs, les cellules alignées s'allongent, fusionnent entre elles et forment progressivement des pseudos tubules. Nous avons testé les effets du peptide HLH vectorisé (composé 1) dans ce système de tubulogenèse *in vitro* de cellules endothéliales humaines issues de cordon ombilical (HUVECs). Des concentrations croissantes de peptide vectorisé (composé 5) ou de cargo seul (composé 1) ont été ajoutées à la fois dans la solution de collagène contenant les cellules et dans le milieu d'activation.

La figure 5 illustre une de ces expériences : le peptide HLH vectorisé (composé 5) affecte très fortement la tubulogenèse entre 7 et 10  $\mu$ M alors que le cargo seul (composé 1) n'a aucun effet dans cette gamme de concentration par rapport aux cultures contrôles (5% DMSO).

6) Effet des peptides sur l'angiogenèse *in vivo* chez la souris (Matrigel plugs).



Le test de Matrigel plugs consiste à injecter en sous-cutané chez la souris du Matrigel, matrice extracellulaire dérivée d'une tumeur murine, capable de déclencher une néovascularisation au sein de l'implant. En effet, les cellules endothéliales de l'hôte, sous l'influence des facteurs pro-angiogéniques contenues dans le Matrigel, migrent vers cette « pseudo-tumeur » et s'infiltrant dans le Matrigel pour organiser un réseau de capillaires entre 5 et 7 jours.

Dans les expériences décrites ci-dessous, deux injections sous-cutanées de Matrigel (500  $\mu$ l) ont été effectuées de part et d'autre de la ligne médiane de l'abdomen. Juste avant l'injection, les souris ont été anesthésiées par inhalation d'isoflurane (Forène®).

Le Matrigel (BDBiosciences ; lot 10403, 13 mg/ml) a été complété par du bFGF (500 ng/ml), de l'héparine (60 U/ml) et les différents peptides SynB3 (composé 7), SynB3-HLH (composé 5), SynB4 (composé 6), SynB4-HLH (composé 4) sont ajoutés à une concentration finale de 20  $\mu$ M en 5% DMSO.

Les souris ont été divisées en 3 groupes de six animaux identiques (mâles C57BL/6 âgés de 6 semaines).

- chaque souris du groupe témoin (souris 1 à 6) a reçu deux injections de Matrigel contenant 5% de DMSO du côté gauche et un peptide témoin anti-angiogénique du côté droit,

- chaque souris du groupe « SynB3 » (souris 7 à 12) a reçu deux injections de Matrigel contenant SynB3 du côté gauche et SynB3-HLH du côté droit,

- chaque souris du groupe « SynB4 » (souris 13 à 18) a reçu deux injections de Matrigel contenant SynB4 du côté gauche et SynB4-HLH du côté droit.

Six jours après l'injection, les souris ont été sacrifiées par inhalation de CO<sub>2</sub> et les implants ont été récupérés pour évaluer l'angiogenèse (photographie et dosage de l'hémoglobine). L'angiogenèse a été quantifiée par dosage de l'hémoglobine contenue dans les implants de Matrigel avec une solution de Drabkin selon les recommandations du vendeur (Sigma Chemical Co).

Les résultats présentés sur les figures 6 (analyse macroscopique) et 7 (dosage de l'hémoglobine), montrent que l'addition des peptides vecteurs seuls n'a pas d'effets significatifs sur l'angiogenèse ; par contre le peptide HLH conjugué avec l'un ou l'autre des vecteurs inhibe efficacement la néovascularisation dans les implants (11 sur 12). Cette inhibition était beaucoup plus importante que celle obtenue par un inhibiteur (Tum) connu pour inhiber l'angiogenèse.

## REVENDICATIONS

1) Molécule peptidique capable d'interférer avec le domaine HLH de TAL-1, constituée par ou comprenant au moins 10 acides aminés successifs et, de préférence, au moins 15 acides aminés successifs du domaine HLH de TAL-1 de séquence :

QQNVNGAFAELRKLIPTHTPPDKKLSKNEILRLAMKYINFLA

correspondant à la SEQ ID No. 1 dans le listage de séquences en annexe ou une séquence équivalente.

2) Molécule peptidique selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle est constituée par ou qu'elle comprend une séquence choisie parmi les séquences suivantes :

- QQNVNGAFAELRKLIPTHTPPDKKLSKNEILRLAMKYINFLA (SEQ ID No. 1 dans la liste de séquences en annexe),

- VRRIFTNSRERWRQQNVNGAFAELRKLI (SEQ ID No. 2 dans la liste de séquences en annexe) et

- PTHPPDKKLSKNEILRLAMKYINFLA (SEQ ID No. 3 dans la liste de séquences en annexe)

ou une séquence équivalente auxdites séquences.

3) Molécule peptidique selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce qu'elle est associée à un vecteur.

4) Molécule peptidique selon la revendication 3, caractérisée en ce que ledit vecteur est choisi, parmi le groupe comprenant :

- un peptide linéaire dérivé de protégrines ou de tachyplésines,

- un peptide linéaire comprenant un domaine de transduction tels que les domaines de transduction de la

protéine Tat de HIV-1 et les domaines de transduction dérivés de la troisième hélice d'Antennapedia,

- des particules comme les liposomes,
- des polymères tels que le polyéthylène glycol (PEG).

5) Molécule peptidique selon l'une quelconque des revendications 3 ou 4, caractérisée en ce que ledit vecteur est un peptide linéaire dérivé de Protégrines, répondant à la formule (I) suivante :

BX(X ou B)BXXXXBBBXXXXXXB (I)

ou un peptide linéaire dérivé de Tachyplésines, répondant à la formule (II) suivante :

(B ou X)XXXBXXXBXXXXBBXB (II),

dans lesquelles :

- les groupes B, identiques ou différents, représentent un résidu d'acide aminé dont la chaîne latérale porte un groupement basique, et

- les groupes X, identiques ou différents, représentent un résidu d'acide aminé aliphatique ou aromatique

ou un fragment de ceux-ci constitué d'une séquence d'au moins 5 et de préférence d'au moins 7 acides aminés successifs des peptides de formules (I) ou (II).

6) Molécule peptidique selon l'une quelconque des revendications 3 à 5, caractérisée en ce que la liaison entre ladite molécule et ledit vecteur est choisie parmi une liaison covalente, une liaison hydrophobe, une liaison ionique, une liaison clivable ou une liaison non clivable dans les milieux physiologiques ou à l'intérieur des cellules.

7) Molécule peptidique selon la revendication 6, caractérisée en ce que ladite liaison peut être directe ou indirecte par l'intermédiaire d'un bras de liaison (linker) et effectuée au moyen d'un groupe fonctionnel naturellement présent ou introduit soit sur le vecteur, soit sur l'inhibiteur, soit sur les deux.

8) Molécule peptidique selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle est choisie parmi les deux composés suivants :

- composé 4 :



- composé 5 :



9) Composition pharmaceutique comprenant comme principe actif au moins une molécule peptidique selon l'une quelconque des revendications précédentes, avantageusement associée dans ladite composition à un véhicule acceptable.

10) Composition pharmaceutique selon la revendication 9, caractérisée en ce qu'elle se présente sous une forme appropriée pour une administration par voie parentérale, par voie orale, par voie rectale, par voie nasale, par voie transdermique, par voie pulmonaire ou par voie centrale.

11) Utilisation d'un composé capable d'inhiber l'interaction entre le domaine HLH de TAL-1 et son partenaire E47 pour la préparation d'un médicament destiné à la prévention et/ou au traitement des maladies liées à l'angiogenèse et, de préférence, au traitement des cancers, de l'artériosclérose et du diabète.

12) Utilisation selon la revendication 11, caractérisée en ce que ledit composé est un inhibiteur compétitif du domaine HLH de TAL-1.

5 13) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 11 ou 12, caractérisée en ce que ledit composé est une molécule peptidique telle que définie dans l'une quelconque des revendications 1 à 8.

10 14) Utilisation selon la revendication 11, caractérisée en ce que ledit composé est un composé capable d'inhiber la fixation de TAL-1 sur son partenaire E47.

15 15) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 11 ou 14, caractérisée en ce que ledit composé est un anticorps reconnaissant soit un épitope au niveau du domaine HLH de TAL-1, soit un épitope au niveau du domaine HLH de E47.

20 16) Procédé pour identifier un composé biologiquement actif susceptible d'être utilisé dans la prévention et/ou le traitement des maladies liées à l'angiogenèse et, de préférence, le traitement des cancers, de l'artériosclérose et du diabète consistant à détecter l'inhibition de  
25 l'interaction entre le domaine HLH de TAL-1 et son partenaire E47 en présence dudit composé.

17) Procédé selon la revendication 16, caractérisé en ce que ledit procédé comprend les étapes suivantes :

30 (a) mettre en contact la protéine TAL-1 (ou un fragment de cette protéine comprenant le domaine HLH), le facteur de transcription E47 (ou un fragment de ce facteur comprenant le domaine HLH) et le composé biologiquement actif à tester,

(b) immunoprécipiter soit la protéine TAL-1 (ou un fragment de cette protéine comprenant le domaine HLH), soit le facteur de transcription E47 (ou un fragment de ce facteur comprenant le domaine HLH),

5 (c) si, à l'étape (b), la protéine TAL-1 (ou un fragment de cette protéine comprenant le domaine HLH) est immunoprécipitée, détecter dans l'immunoprécipitat obtenu à l'étape (b), la présence du facteur de transcription E47 (ou d'un fragment de ce facteur comprenant le domaine HLH),

10 (d) si, à l'étape (b), le facteur de transcription E47 (ou un fragment de ce facteur comprenant le domaine HLH) est immunoprécipité, détecter dans l'immunoprécipitat obtenu à l'étape (b), la présence de la protéine TAL-1 (ou d'un fragment de cette protéine comprenant le domaine HLH),

15 dans le cas où le facteur de transcription E47 (ou un fragment de ce facteur comprenant le domaine HLH) n'est pas présent à l'étape (c) ou si la protéine TAL-1 (ou un fragment de cette protéine comprenant le domaine HLH) n'est pas présente à l'étape (d), ledit composé est un agent  
20 susceptible d'être utilisé dans la prévention et/ou le traitement des maladies liées à l'angiogenèse et, de préférence, le traitement des cancers, de l'artériosclérose et du diabète.

25 18) Procédé selon la revendication 16, caractérisé en ce que, ledit procédé comprend les étapes suivantes :

(a') mettre en contact la protéine TAL-1 (ou un fragment de cette protéine comprenant le domaine HLH), le facteur de transcription E47 (ou un fragment de ce facteur  
30 comprenant le domaine qui interagit avec TAL-1) et le composé biologiquement actif à tester,

(b') faire migrer sur un gel de polyacrylamide non dénaturant le mélange obtenu à l'étape (a'),

(c') visualiser l'absence ou la présence du complexe  
35 TAL-1 (ou un fragment de cette protéine comprenant le

domaine HLH) et E47 (ou un fragment de ce facteur comprenant le domaine qui interagit avec TAL-1).



Figure 1

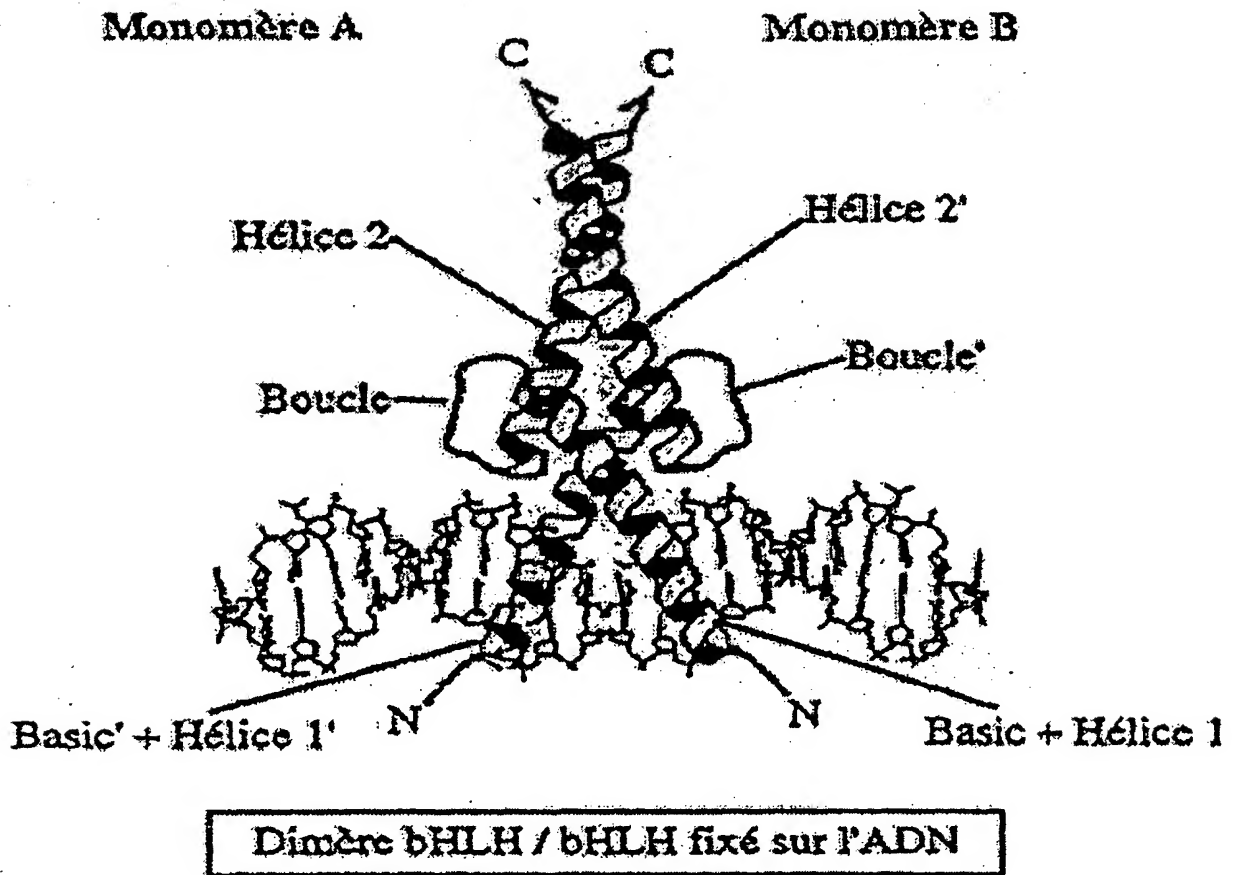


Figure 2

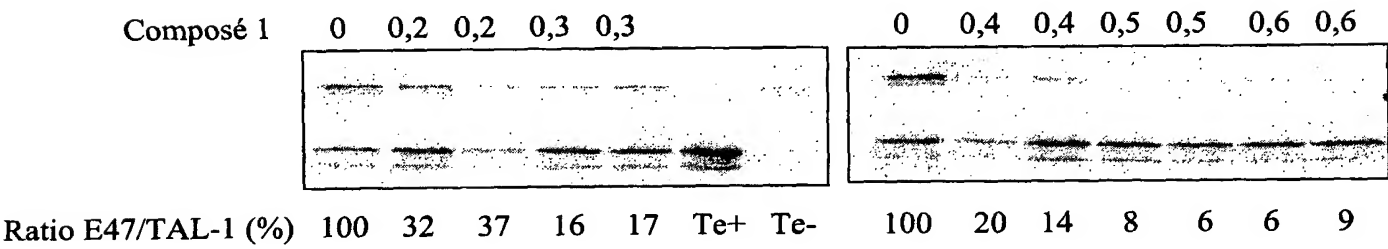
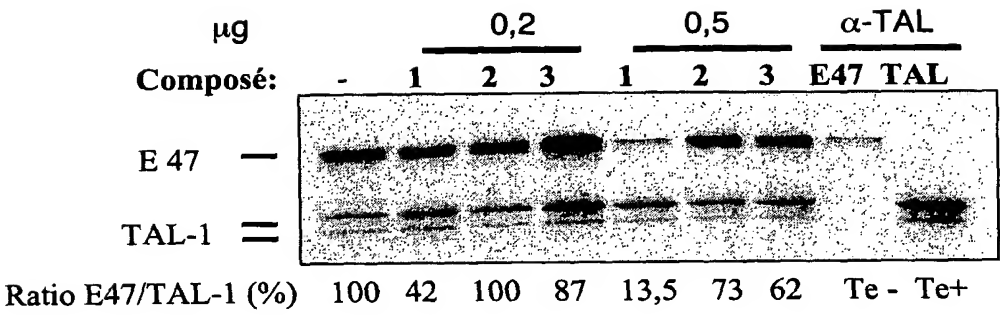


Figure 3

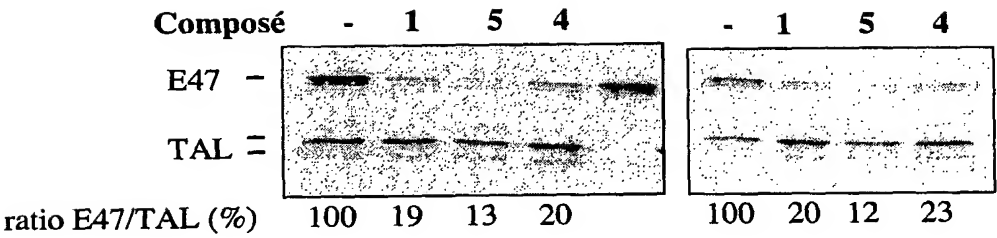
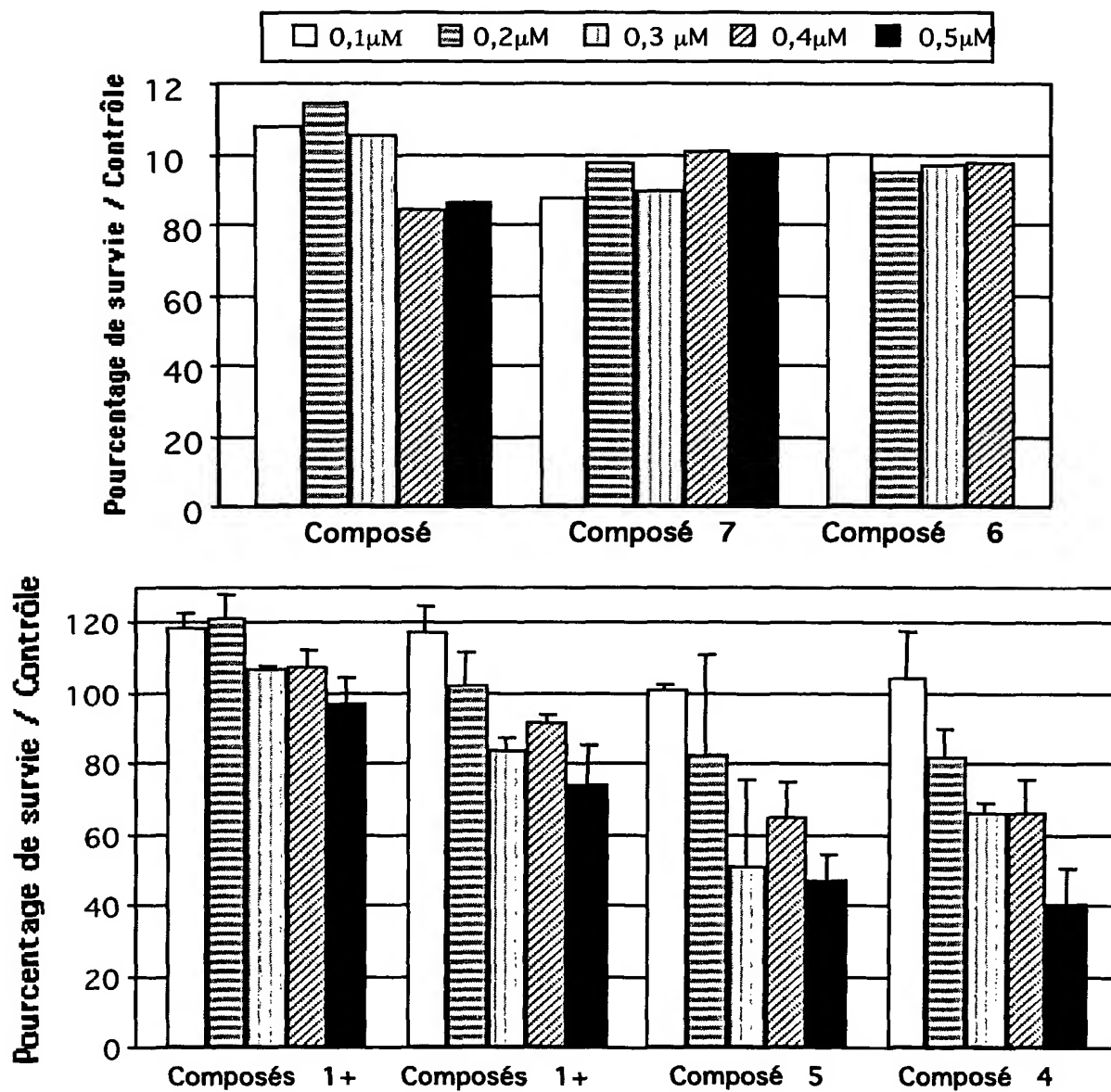


Figure 4



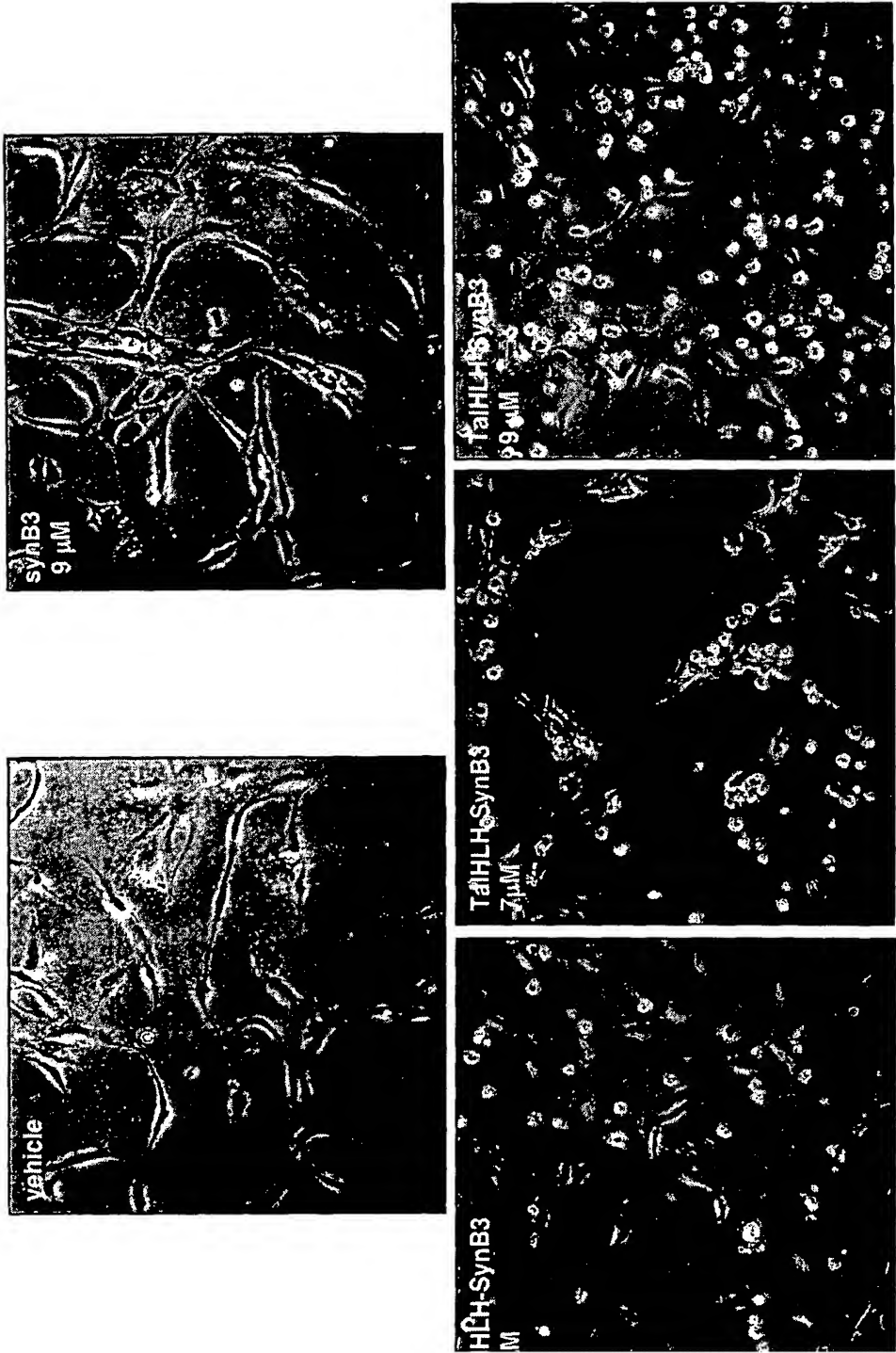


Figure 5

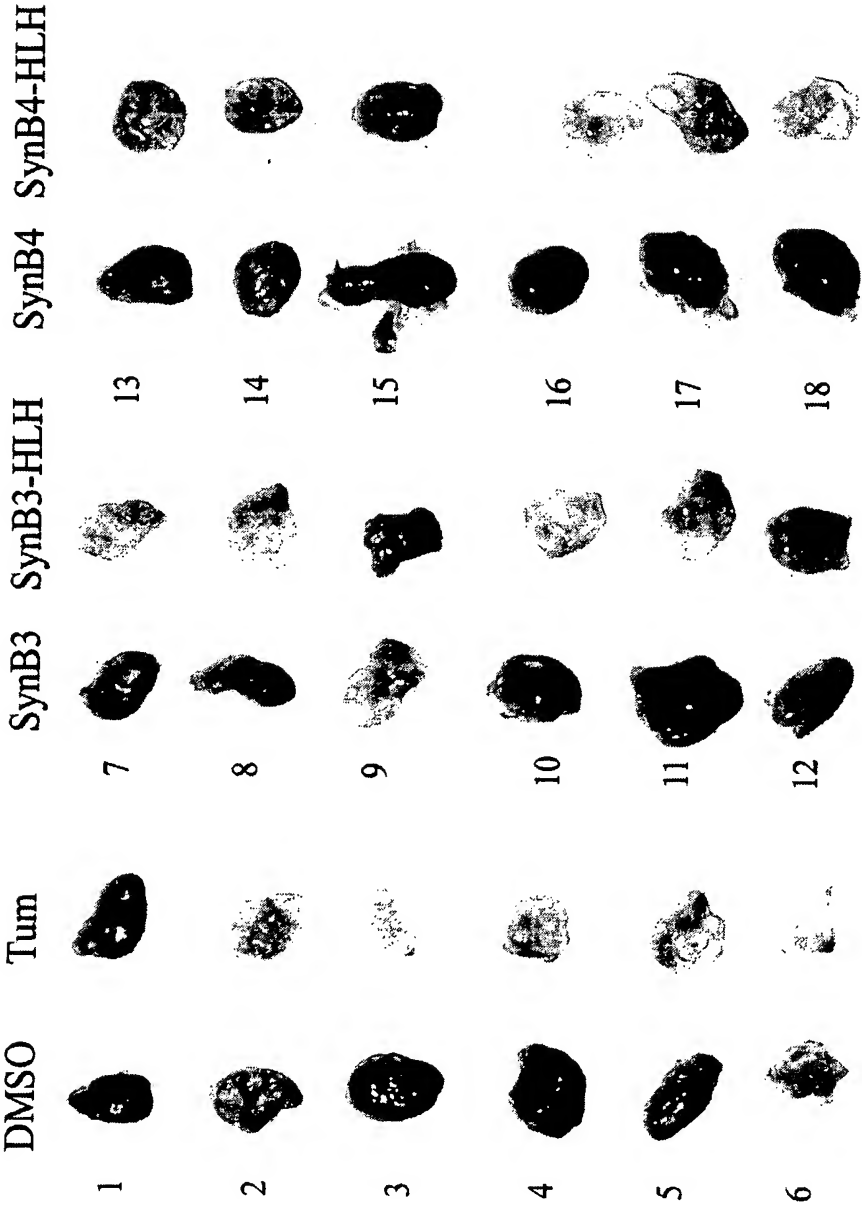
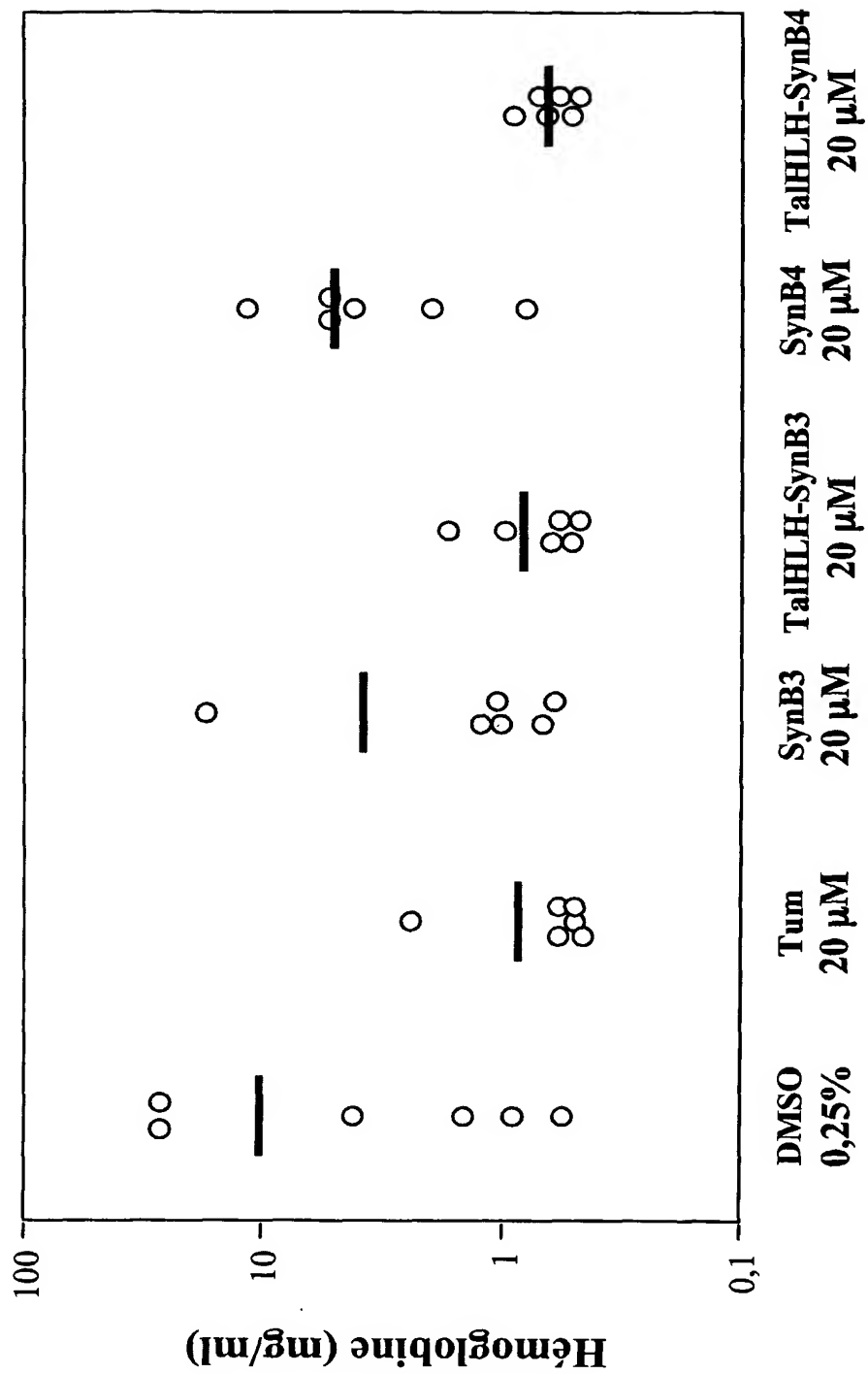


Figure 6



## Figure 7

## SEQUENCE LISTING

<110> SYNT:EM

<120> Inhibiteurs de l'angiogenèse, compositions les contenant et leur utilisation pour le traitement des maladies liées à une dérégulation de l'angiogenèse

<130> 35713/PCT

<140> PCT/FR05/XXXXX

<141> 2005-02-02

<150> FR04/05954

<151> 2004-06-02

<150> FR04/00964

<151> 2004-02-02

<160> 7

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 41

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> DOMAIN

<222> (1)..(41)

<223> Domaine HLH de TAL-1 (hélice 1-boucle-hélice-2)

<400> 1

Gln	Gln	Asn	Val	Asn	Gly	Ala	Phe	Ala	Glu	Leu	Arg	Lys	Leu	Ile	Pro
1				5					10					15	

Thr	His	Pro	Pro	Asp	Lys	Lys	Leu	Ser	Lys	Asn	Glu	Ile	Leu	Arg	Leu
			20					25					30		

Ala	Met	Lys	Tyr	Ile	Asn	Phe	Leu	Ala
		35					40	

<210> 2

<211> 28

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> DOMAIN

<222> (1)..(28)

<223> Domaine composé de la région basique et de l'hélice 1 du domaine HLH de TAL-1

<400> 2



Val Arg Arg Ile Phe Thr Asn Ser Arg Glu Arg Trp Arg Gln Gln Asn  
 1 5 10 15

Val Asn Gly Ala Phe Ala Glu Leu Arg Lys Leu Ile  
 20 25

<210> 3  
 <211> 26  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 <221> DOMAIN  
 <222> (1)..(26)  
 <223> Domaine composé de la boucle et de l'hélice 2 du domaine HLH de T  
 AL-1

<400> 3

Pro Thr His Pro Pro Asp Lys Lys Leu Ser Lys Asn Glu Ile Leu Arg  
 1 5 10 15

Leu Ala Met Lys Tyr Ile Asn Phe Leu Ala  
 20 25

<210> 4  
 <400> 4  
 000

<210> 5  
 <400> 5  
 000

<210> 6  
 <212> PRT  
 <213> unidentified

<220>  
 <221> PEPTIDE  
 <222> (1)..(17)  
 <223> SynB4

<400> 6

Ala Trp Ser Phe Arg Val Ser Tyr Arg Gly Ile Ser Tyr Arg Arg Ser  
 1 5 10 15

Arg

<210> 7  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> unidentified

<220>  
<221> PEPTIDE  
<222> (1)..(10)  
<223> SynB3

<400> 7

Arg	Arg	Leu	Ser	Tyr	Ser	Arg	Arg	Arg	Phe
1				5					10

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR2005/000222

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07K14/47 G01N33/50 C12N15/62

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K G01N C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, INSPEC, MEDLINE, BIOSIS, WPI Data, Sequence Search, EMBASE

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>GOLDFARB A N ET AL: "Identification of a highly conserved module in E proteins required for in vivo helix-loop-helix dimerization"</p> <p>JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 30 JAN 1998 UNITED STATES, vol. 273, no. 5, 30 January 1998 (1998-01-30), pages 2866-2873, XP002330408 ISSN: 0021-9258 figures 1,6</p> <p>----- -/--</p>	1,2

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents:

\*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

\*E\* earlier document but published on or after the international filing date

\*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

\*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

\*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

3 June 2005

Date of mailing of the international search report

27/06/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Espen, J

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR2005/000222

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>GOLDFARB A N ET AL: "Nuclear redirection of a cytoplasmic helix-loop-helix protein via heterodimerization with a nuclear localizing partner." EXPERIMENTAL CELL RESEARCH, 214 (2) 481-5. JOURNAL CODE: 0373226. ISSN: 0014-4827., October 1994 (1994-10), XP002289011 the whole document</p>	1,2
A	<p>----- DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 16 November 2001 (2001-11-16), LAZRAC MONIA ET AL: "Upregulation of the basic helix-loop-helix TAL-1 transcription factor in endothelial cells: A switch from quiescent to angiogenic phenotype?" XP002312562 Database accession no. PREV200200129555 &amp; BLOOD, vol. 98, no. 11 Part 1, 16 November 2001 (2001-11-16), page 30a, 43RD ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY, PART 1; ORLANDO, FLORIDA, USA; DECEMBER 07-11, 2001 ISSN: 0006-4971</p>	
A	<p>----- WO 00/09657 A (LEE MU EN ; HARVARD COLLEGE (US); MAEMURA KOJI (US); HIESH CHUNG MING) 24 February 2000 (2000-02-24) pages 29-36; claims 1-56</p>	
A	<p>----- WO 02/02595 A (SYNT EM S A ; DRIN GUILLAUME (FR); GOMAR JEROME (FR); REES ANTHONY R ( ) 10 January 2002 (2002-01-10) the whole document</p>	
A	<p>----- DAY FIONA H ET AL: "Induction of antigen-specific CTL responses using antigens conjugated to short peptide vectors." JOURNAL OF IMMUNOLOGY (BALTIMORE, MD. : 1950), (2003 FEB 1) 170 (3) 1498-503. JOURNAL CODE: 2985117R. ISSN: 0022-1767., 1 February 2003 (2003-02-01), XP002259153 the whole document</p>	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR2005/000222

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.: **11, 12, 14**  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
**See supplemental sheet**
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

### Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR2005/000222

## Continuation of Box II

### Claims 11, 12 and 14

Claims 11, 12 and 14 relate to a compound defined by reference to a desirable characteristic or property, namely a "compound capable of inhibiting interaction between the HLH domain of TAL-1 and its binding partner E47 (competitive inhibitor), more particularly a compound capable of inhibiting the binding of TAL-1 to its binding partner E47". The claims cover all compounds that exhibit this characteristic or property, and yet only very few such compounds are supported in accordance with PCT Article 6 and/or disclosed in accordance with PCT Article 5. In the present case the claims are so lacking in support and the disclosure in the application is so inadequate that it is not possible to carry out a meaningful search. Irrespective of this, the claims also lack clarity because they attempt to define the compounds in terms of the result which is to be achieved. This lack of clarity too is such that it is impossible to carry out a meaningful search.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). The applicant is advised that it is not normally the policy of the EPO in its capacity as International Preliminary Examining Authority to carry out a preliminary examination for subject matter that has not been searched. This applies whether or not the claims were amended after receipt of the search report or in the course of the procedure under PCT Chapter II. The applicant is reminded that if the application proceeds to the regional phase before the EPO an additional search may be carried out in the course of the examination (cf. EPO Guidelines, Part C, VI, 8.5) on the condition that the problems that led to the declaration under PCT Article 17(2) have been resolved.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR2005/000222

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0009657	A	24-02-2000	AU 5562999 A	06-03-2000
			WO 0010096 A1	24-02-2000
			WO 0009657 A2	24-02-2000
			US 2003032609 A1	13-02-2003
			US 6395548 B1	28-05-2002
<hr/>				
WO 0202595	A	10-01-2002	FR 2810985 A1	04-01-2002
			AU 7261501 A	14-01-2002
			CA 2414355 A1	10-01-2002
			EP 1297001 A1	02-04-2003
			WO 0202595 A1	10-01-2002
			JP 2004517039 T	10-06-2004
			US 2003186890 A1	02-10-2003
<hr/>				

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR2005/000222

**A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE**  
CIB 7 C07K14/47 G01N33/50 C12N15/62

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C07K G01N C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, INSPEC, MEDLINE, BIOSIS, WPI Data, Sequence Search, EMBASE

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>GOLDFARB A N ET AL: "Identification of a highly conserved module in E proteins required for in vivo helix-loop-helix dimerization"</p> <p>JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 30 JAN 1998 UNITED STATES, vol. 273, no. 5, 30 janvier 1998 (1998-01-30), pages 2866-2873, XP002330408 ISSN: 0021-9258 figures 1,6</p> <p>----- -/--</p>	1,2

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- \*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- \*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- \*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- \*Z\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

3 juin 2005

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

27/06/2005

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Espen, J



# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR2005/000222

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>GOLDFARB A N ET AL: "Nuclear redirection of a cytoplasmic helix-loop-helix protein via heterodimerization with a nuclear localizing partner."  EXPERIMENTAL CELL RESEARCH, 214 (2) 481-5.  JOURNAL CODE: 0373226. ISSN: 0014-4827.,  octobre 1994 (1994-10), XP002289011  le document en entier</p> <p>-----</p>	1,2
A	<p>DATABASE BIOSIS 'Online!  BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE,  PHILADELPHIA, PA, US;  16 novembre 2001 (2001-11-16),  LAZRAC MONIA ET AL: "Upregulation of the basic helix-loop-helix TAL-1 transcription factor in endothelial cells: A switch from quiescent to angiogenic phenotype?"  XP002312562  Database accession no. PREV200200129555  &amp; BLOOD,  vol. 98, no. 11 Part 1,  16 novembre 2001 (2001-11-16), page 30a,  43RD ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY, PART 1; ORLANDO, FLORIDA, USA; DECEMBER 07-11, 2001  ISSN: 0006-4971</p> <p>-----</p>	
A	<p>WO 00/09657 A (LEE MU EN ; HARVARD COLLEGE (US); MAEMURA KOJI (US); HIESH CHUNG MING)  24 février 2000 (2000-02-24)  pages 29-36; revendications 1-56</p> <p>-----</p>	
A	<p>WO 02/02595 A (SYNT EM S A ; DRIN GUILLAUME (FR); GOMAR JEROME (FR); REES ANTHONY R ( ) 10 janvier 2002 (2002-01-10)  le document en entier</p> <p>-----</p>	
A	<p>DAY FIONA H ET AL: "Induction of antigen-specific CTL responses using antigens conjugated to short peptide vectors."  JOURNAL OF IMMUNOLOGY (BALTIMORE, MD. : 1950), (2003 FEB 1) 170 (3) 1498-503.  JOURNAL CODE: 2985117R. ISSN: 0022-1767.,  1 février 2003 (2003-02-01), XP002259153  le document en entier</p> <p>-----</p>	

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°  
PCT/FR2005/000222

## Cadre II Observations – lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 2 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☐ Les revendications n<sup>os</sup> se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:
2. ☒ Les revendications n<sup>os</sup> 11, 12, 14 se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:  
voir FEUILLE ANNEXÉE PCT/ISA/210
3. ☐ Les revendications n<sup>os</sup> sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

## Cadre III Observations – lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 3 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. ☐ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n<sup>os</sup>
4. ☐ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n<sup>os</sup>

Remarque quant à la réserve

- ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- ☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

**SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR PCT/ISA/ 210**

Suite du cadre II.2

Revendications nos.: 11,12,14

Les revendications 11,12 et 14 présentes réfèrent à un composé défini en faisant référence à une caractéristique ou propriété souhaitable, à savoir un "composé capable d' inhiber (inhibiteur compétitif) l' interaction entre le domaine HLH de TAL-1 et son partenaire E47, en particulier un composé capable d' inhiber la fixation de TAL-1 sur son partenaire E47.

Les revendications couvrent tous les composés présentant cette caractéristique ou propriété, alors que la demande ne fournit un fondement au sens de l' Article 6 PCT et/ou un exposé au sens de l' Article 5 PCT que pour un nombre très limité de tels composés. Dans le cas présent, les revendications manquent de fondement et la demande manque d' exposé à un point tel qu' une recherche significative était impossible. Indépendamment des raisons évoquées ci-dessus, les revendications manquent aussi de clarté. En effet, on a cherché à définir le composé au moyen du résultat à atteindre. Ce manque de clarté est, dans le cas présent, de nouveau tel qu' une recherche significative était impossible.

L'attention du déposant est attirée sur le fait que les revendications ayant trait aux inventions pour lesquelles aucun rapport de recherche n' a été établi ne peuvent faire obligatoirement l'objet d' un rapport préliminaire d' examen (Règle 66.1(e) PCT). Le déposant est averti que la ligne de conduite adoptée par l' OEB agissant en qualité d' administration chargée de l' examen préliminaire international est, normalement, de ne pas procéder à un examen préliminaire sur un sujet n' ayant pas fait l' objet d' une recherche. Cette attitude restera inchangée, indépendamment du fait que les revendications aient ou n' aient pas été modifiées, soit après la réception du rapport de recherche, soit pendant une quelconque procédure sous le Chapitre II. Si la demande devait être poursuivie dans la phase régionale devant l' OEB, il est rappelé au déposant qu' une recherche pourrait être effectuée durant la procédure d' examen devant l' OEB (voir Directive OEB C-VI, 8.5) à condition que les problèmes ayant conduit à la déclaration conformément à l' Article 17(2) PCT aient été résolus.

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale No

PCT/FR2005/000222

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
WO 0009657	A	24-02-2000	AU	5562999 A	06-03-2000
			WO	0010096 A1	24-02-2000
			WO	0009657 A2	24-02-2000
			US	2003032609 A1	13-02-2003
			US	6395548 B1	28-05-2002
-----					
WO 0202595	A	10-01-2002	FR	2810985 A1	04-01-2002
			AU	7261501 A	14-01-2002
			CA	2414355 A1	10-01-2002
			EP	1297001 A1	02-04-2003
			WO	0202595 A1	10-01-2002
			JP	2004517039 T	10-06-2004
US	2003186890 A1	02-10-2003			
-----					